Lane Medical Library

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik
Vorstand: Prof. Dr. **Georg Haas.**

1926

Zur Methodik der Bestimmung des gebundenen Amino-N im Blutserum.

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Hessischen Landes-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Aron Feller
geboren in Kowno (Litauen)

Gießen 1926

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Hessischen Landes-Universität zu Gießen.
Berichterstatter: Prof. Dr. **Georg Haas.**

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154005_0246

Zur Methodik der Bestimmung des gebundenen Amino-N im Blutserum.

Hülse und Strauß kommen in ihrer bekannten Arbeit „zur Frage der Blutdrucksteigerung“ zu dem Resultate, daß im Blute der chronischen Nephritiden höhere Eiweisspaltprodukte (Peptone) auftreten, während im Gegensatze hierzu das Blut der essentiellen Hypertonie solche vermissen läßt. Den Beweis für die Anwesenheit solcher höheren Spaltprodukte im Blute sehen die genannten Forscher dadurch erbracht, daß sie einen beträchtlichen Anstieg des Formoltitrierbaren Amino-N nach Säurehydrolyse beobachten konnten.

Hülse und **Strauß** hielten sich umso mehr berechtigt diese nach Säurehydrolyse hervortretende Erhöhung des Amino-N mit einem vermehrten Peptongehalt in Zusammenhang zu bringen als es ihnen geglückt sei in solchen Fällen im eiweißfreien Trichloressigsäurefiltrat eine positive Biuretreaktion zu erzielen.

Orientierende unveröffentlichte Versuche über das Auftreten einer positiven Biuretreaktion im eiweißfreien Blutfiltrat praeurämischer nnd urämischer Patienten überzeugten Prof. **Haas** nicht von der Anwesenheit biureter Substanzen und auch **Becher** schreibt, daß es ihm nie mit Sicherheit geglückt sei, eine positive Biuretreaktion im enteiweißten Blutfiltrat zu erhalten, selbst bei hohen Amino-Nwerten nach Säurehydrolyse. Es scheint deshalb berechtigt, die Frage aufzuwerfen, ob die Erhöhung des formoltitrierbaren Amino-N nach Säurehydrolyse auch wirklich auf Peptone zu beziehen ist, oder ob nicht andere Faktoren für die diesbezügliche Amino-N-Erhöhung verantworttich zu machen sind. In erster Linie wäre an eine Abspaltung von Ammoniak aus dem Harnstoff bei Säurehydrolyse zu denken. **Hülse** und **Strauß**

schreiben zwar, daß sie nach durchgeführter Hydrolyse das Blutfiltrat mit 33% iger Natronlauge alkalisch gemacht und nach 15 Minuten langem Kochen alles Ammoniak entfernt hätten. **Becher** und **Elfriede Herrmann** schreiben jedoch, daß sie die Beobachtung machen mußten, daß bei der Hydrolyse unter denselben Bedingungen wie sie **Hülse** und **Strauß** einhielten (10% iger Schwefelsäuregehalt, 7 stündiges Kochen) „ein erheblicher Teil des Harnstoffes nicht gespalten wird". **Becher** und **E. Herrmann** sagen weiter, „wenn man dann nach Hydrolyse alkalisch macht, und zur Entfernnng des gebildeten Ammoniak offen mit Natronlauge kocht, kann die Spaltung des noch vorhandenen Harnstoffes weiter gehen und nach einer, zum Vertreiben des durch die Säurehydrolyse gebildeten Ammoniaks, ausreichender Zeit noch lange nicht vollendet sein". **Schloßmann,** der den Gehalt des Blutes an Amino-Säuren in der Schwangerschaft, Geburt und Wochenbett studierte, befaßt sich mit der Ammoniak-Bildung nach Säurehydrolysen überhaupt nicht und schreibt nur,: „Die Amino-Säuren wurden nach Folin bestimmt. Von den Bestandteilen des Rest-N reagiert nur noch das Ammoniak mit der β=Naphtochinonsulfosäure, jedoch sei wie schon vorhin betont, die Menge des Ammoniaks im Blute so gering, (0,14 mg %), daß sie gegenüber des Amino-Säure-N kaum ins Gewicht fällt".

Die Frage der künstlichen Ammoniak-Bildung nach Säurehydrolyse wird demnach von **Schloßmann** gar nicht zur Debatte gezogen. Andererseits muß aber auffallen, daß wenn wirklich die künstliche Ammoniak-Bildung bei den einzelnen Blutanalysen eine maßgebende Rolle spielt, und Fehlerquellen in dem von **Becher** genannten Sinne (unvollständige Aufspaltung des Harnstoffes bei der Hydrolyse) in Betracht gezogen werden müssen, speziell die Blutfiltrate von Patienten mit essentieller Hypertonie stets niedrige N-Werte nach Hydrolyse geben, während die Fälle von Eklampsie, chronischer Nephritis etc, in der Arbeit von **Hülse** und **Strauß** deutliche Vermehrung des Stickstoffes aufweisen. Gewiß könnte diese N-Erhöhung zum Teil mit der erhöhten Harnstoffkonzentration und der dadurch vermehrten Auf-

spaltung von Ammoniak im Blute in Zusammenhang gebracht werden, aber wenn wirklich ein methodischer Fehler bei der Erhöhung der N-Werte nach Säurehydrolyse in Frage kommt, dann müßte auch der eine oder andere Fall bei essentieller Hypertonie aus der Reihe fallen. Es schien deshalb wünschenswert, die Frage zu klären, ob bei der Harnstoffkonzentration, wie sie im Blute auftritt, nach Säurehydrolyse NH_3 Mengen in Erscheinung treten, die das kolorimetrische Ergebnis beinflussen.

Die N-bestimmung geschah nach der **Folin**'schen Methode.[1] Es wurden zunächst die Fehlergrenzen festgestellt, die sich beim Arbeiten mit einer wässerigen Amino-Säurelösung ergeben. Ich ging dabei folgendermaßen vor: Die N-Menge einer Glycocolllösung von bekanntem Glycocollgehalt sollte wiedergefunden werden.

0,1 gr Glycocoll wurden in 100 ccm Wasser gelöst. 5 ccm dieser Lösung wurden mit Wasser auf 100 ccm gebracht. Davon wurden 5 ccm (0,00025 gr Glycocoll = 0,046 mgN) zur Kolometrie angesetzt. Es wurden zu diesem Zwecke in ein Meßkölbchen von 25 ccm Inhalt hineingegeben: 5 ccm der zu kolometrierenden Glycocolllösung, ein Tropfen Phenolphtalinlösung, Soda, entsprechend den Angaben von **Folin**, 1 ccm Naphtochinonlösung (0,1 gr gelöst in 20 ccm Wasser). Dies Gemisch wird 20 Stunden stehen gelassen, danach mit 1 ccm Acetessigsäureacetatlösung (ihre Darstellung ist folgendermaßen: 50 ccm Eisessig + 50 ccm Wasser, davon wurden 20 ccm mit 20 ccm Natriumacetatlösung zusammengebracht) und 1 ccm Thiosulfat versetzt. Diese Mischung wird bis zur Marke 25 mit Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wird mit der standartlösung kolorimetrisch verglichen. Die Standartlösung wurde entsprechend den Angaben von **Folin** hergestellt. 1 ccm dieser Standartlösung enthält 0,0018 mg N. —

Berechnung: 3,2 ccm des Reaktionsgemisches entsprechen 3 ccm der Standartlösung, demnach enthalten die 3,2

1) Die dazu nötige Naphtochinonsulfosäure wurde von Prof. **Haas** synthetisch hergestellt.

ccm = 0,0018 + 3 = 0,0054mg = N, Diese 3,2 ccm entstammen einem Volumen von 25 ccm. In 25 ccm sind somit $\frac{0{,}0054.25}{3{,}2}$ mg N = 0,042 mgN. In 5 ccm der zur Kolometrie angesetzten Glycocolllösung wurden demnach 0,042 mgN gefunden; berechnet sind 0,046 mgN. Die Fehlergrenze beträgt hier 0,08 mg % N.

In analoger Weise wurden 2 ccm resp. 3 ccm Glycocolllösung zur Kolometrie angetzt. Bei 2 ccm fand sich ein Wert von 0,02 mg, berechnet sind 0,018 mg. Die Fehlergrenze beträgt hier 0,1 mg % N. Bei 3 ccm fand sich ein Wert von 0,025 mg N, berechnet sind 0,027 mgN. In diesem Falle beträgt die Fehlergrenze 0,06 mg % N. Es zeigt sich somit, daß die Methodik innerhalb sehr geringer Fehlergrenzen durchführbar ist. In allen diesen Fällen überschritten die Fehler nicht den Wert von 0,1 mg % N. Wir gingen nun weiter zur Bestimmung der freien Amino-Gruppen im Serum. Die Enteiweißung geschah durch 20 %ige Trichloressigsäurelösung. Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren: 2 ccm Serum werden in ein Meßkölbchen von 20 ccm Inhalt mit Wasser und 4 ccm 20 %iger Trichloressigsäurelösung versetzt, Durchschüttelt nnd mit Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt. 5 ccm des Filtrates werden dann genau so wie es oben bei der Glycocolllösung beschrieben, zur Kolorimetrie angesetzt. Es wurden dann demselben Serum bestimmte Mengen Glycocolllösung zugesetzt und geprüft, inwieweit sich der zugesetzte Amino-N wieder finden läßt.

Im Serum A ohne Zusatz wurden gefunden 8,1 mg % Amino-N.

Im Serum A mit Zusatz von 0,0025 gr Glycocoll = 0,45 mg N pro 100 ccm Serum werden gefunden, 8,45 mg % Amino-N, berechnet, 8,55 mg % N, der Fehler beträgt also 0,1 mg % N.

Serum A mit Zusatz von 0,05 gr Glycocoll = 0,9 mg N pro 100 Serum ließ sich finden 8,8 mg % N; berechnet waren 9,0 mg % N. Hier beträgt demnach der Fehler 0,2 mg % N.

Serum B ohne Zusatz enthält 9,9 mg % Amino-N.

Serum B mit Zusatz von 0,0025 gr Glycocoll = 0,45 mg N pro 100 ccm Serum, enthält 10,57 mg % Amino-N, berechnet sind 10,35 mg % Amino-N; also beträgt der Fehler 0,22 mg % N.

Im Serum B mit Zusatz von 0,005 gr Glycocoll = 0,9 mg N pro 100 ccm Serum ließ sich finden 11,0 mg % N, berechnet sind 10,8 mg % N, also hier beträgt der Fehler 0,2 mg % N.

Serum C ohne Zusatz enthält 12,0 mg % Amino-N. Im Serum C mit Zusatz von 0,0025 gr Glycocoll = 0,45 mg N pro 100 ccm Serum fand man 12,6 mg % N, berechnet sind 12,45 mg % Amino-N, also der Fehler beträgt hier 0,15 mg % N.

Im Serum C mit Zusatz von 0,005 gr Glycocoll = 0,9 mg N pro 100 ccm Serum fand man 13,2 mg % Amino = N, berechnet waren 12,9 mg % Amino = N, also ein Fehler von 0,3 mg % N ist hier vorhanden.. Die Fehler überschritten demnach bei allen durchgeführten Untersuchuugen nicht den Wert von 0,3 % N.

In Bezug auf die Frage ob unter den angewandten Arbeitsbedingungen Harnstoff bei der Säurehydrolyse Ammoniak abspaltet, wurden folgende 5 Versuchsreihen angestellt: Es wurden jedesmal versetzt: 2 ccm einer bestimmten Harnstofflösung (0,15 gr in 100 ccm Wasser gelöst) mit 14 ccm Wasser, und 4 ccm 20 %iger Trichloressigsäurelösung. Davon wurden zu 15 ccm 3 ccm einer 50 %igen Schwefelsäurelösung zugegeben. Die erste Probe wurde ohne zu kochen kolorimetriert.

Die zweite Probe wurde 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht und sodann der Kolorimetrie unterzogen.

Die dritte Probe wurde 4 Stunden am Rückflußkühler gekocht und sodann der Kolorimetrie unterzogen.

Die vierte Probe wurde 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und sodann der Kolorimetrie unterzogen.

Die fünfte Probe wurde 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht und sodann der Kolorimetrie unterzogen.

Aus der 1. Probe (ohne zu erhitzen) entsprachen 3 ccm der Standartlösung, 3,9 ccm der Vergleichslösung.

Aus der 2. Probe (2 stündiges Kochen) entsprachen 3 ccm der Standartlösung, 3,8 ccm der Vergleichslösung.
Aus der 3. Probe (4 stündiges Kochen) entsprachen 3 ccm der Standartlösung, 3,9 ccm der Vergleichslösung.
Aus der 4. Probe (6 stündiges Kochen) entsprachen 3 ccm der Standartlösung, 4,0 ccm der Vergleichslösung.
Aus der 5. Probe (8 stündiges Kochen) entsprachen 3 ccm der Standartlösung, 3,9 ccm der Vergleichslösung.

Das kolorimetrische Resultat war stets das Ergebeis von Doppelbestimmungen. Aus diesen Versuchen geht somit deutlich hervor, daß unter den genannten Arbeitsbedingungen bei der Säurehydrolyse keine Ammoniakabspaltnng aus Harnstoff zu befürchten ist. Es erübrigt sich demnach, im Serumfiltrat, nach durchgeführter Säurehydrolyse eine Vertreibung des Ammoniaks vorzunehmen, im Gegenteil eine solche kann schädlich sein und Anlaß von neuen Fehlerquellen werden, wenn sie durch Kochen mit Natronlauge geschieht.

Daß die nach Säurehydrolyse zum Vorschein kommenden freien Amino-Gruppen nicht ohne weiteres als ein Beweis für die Anwesenheit von Peptonen im Blute angesehen werden können, liegt auf der Hand. Es könnte sich bei diesem Vorgang ebenso gut um die Abspaltung von Benzoyl-Acetyl-Methyl-Formyl- u. a. Gruppen von Amino-Säuren handeln.

Diese Frage soll zunächst durch Zusatz von Hippursäure zum Serum und darauf folgender Hydrolyse noch näher studiert werden.

Zum Schluß möchte ich nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. **Haas** für die Überlassung der Arbeit und seine Unterstützung und Herrn Dr. **Trautmann** für die Einführung in die Methotik meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Herrn Prof. Dr. **Haas** danke ich für die Übernahme des Referates.

Literatur.

Folin, Otto. A colorimetric method for the determination of sugars in normal human urine. The Journal of biologiae chemistry 1922, Manch.

Becher und Elfriede **Herrmann**. Über freie und gebundene Aminosäuren im Blute bei Niereninsufficenz. München. med. Woch. 1925 Nr. 26.

Hülse und **Strauß**. Zur Frage der Blutdrucksteigerung. Über die Wirkung höherer Eiweißspaltprodukte auf den Blutdruck und das Vorkommen im Blute bei hypertonischen Nierenerkrankungen. Zeitschrift für die gesamte exper. med. 1924 Band 39.

Schloßmann. Der Gehalt des Blutes an Aminosäuren und Polypeptiden in der Schwangerschaft, Geburt und Wochenbett mit besonderer Berücksichtigung des Schwangerschaftstoxämien. Zeitschrift für die gesamte exper. med. 1925 Band 17, Heft 47.

Lebenslauf.

Am 27. September 1903 wurde ich, Aron Feller, in Kowno (Litauen) geboren. Besuchte das Realgymnasium zu Kowno, wo ich am 11. Juni 1920 das Maturitätsexamen bestanden habe.

Seit dem 1. Mai 1921 besuchte ich die Universität in Gießen, wo ich 10 Semester verbracht habe.

Im Juli 1923 bestand ich die ärztliche Vorprüfung.